

OTKA F049637

Dr. Gárdonyi Márk

A búza 1Bx7 HMW glutenin alegység túltermelés molekuláris alapjainak vizsgálata

ZÁRÓJELENTÉS

Budapest, 2007. február 28.

Bevezetés:

A gabonakereskedelem a fogyasztói és a feldolgozóipari igényekből kiindulva a búzaszem endospermium és fehérjetartalom alapján különíti el az egyes minőségi osztályokat. Elsősorban az Egyesült Államokban, Kanadában és Ausztráliában alakult ki búza minőség szerinti osztályozási rendszer a világon. Európában csak az elmúlt évtizedben kezdődött meg az észak-amerikai minőségi osztályok átvétele és alkalmazása a nemesítésben, a termesztésben, a feldolgozóiparban, valamint a kereskedelemben. A magyar szabvány szintén az európai rendszerhez hasonló minősítést használ, és nem különíti el az egyes minőség típusokat az endospermium szerkezet, a szemszín vagy az életforma szerint. Alapvetően a siker mennyisége és minősége alapján malmi, javító és takarmánybúza csoportokat különít el. Általában megállapítható, hogy a magyar búza az észak-amerikai osztályozás szerint a kemény, piros szemű csoportba sorolható. A különböző minőségi osztályba tartozó búza sütőipari tulajdonságait, egyes nagy molekulásúlyú (HMW) glutenin fehérje alegységek jelenléte és az egyes alegységek relatív mennyisége egyaránt befolyásolják. A HMW glutenin fehérje alegység génjei három különböző lókuszon kódoltak (Glu-A1, Glu-B1, Glu-D1) és minden lókuszt két különböző szorosban kapcsolt gént tartalmaz (x, y típus). A tartalékfehérje összetétel azonosítása és a fajtákban előforduló allélek izolálása lehetővé teszi a fajtában rejlő jó sütőipari és technológiai tulajdonságok modern fajtákba történő beépítését.

A Glu-B1-en kódolt HMW gluteninek közül a Bx7 számos kenyér és durum búza fajtában fordul elő és minőség meghatározó szerepének vizsgálata napjainkban különösen nagy figyelmet kap. SDS-PAGE módszerrel a Bx7 alegység erősebb sávot ad a többi HMW glutenin alegységhez képest. Különböző búzafajták Bx7 alegységének mobilitása között azonban SDS poliakrilamid gélen különbségeket találtak. Marchylo és mtsai. (1992) szerint legalább kétféle 1Bx7 fehérje létezik a különböző fajtákban, melyeket 7 és 7*-nak neveztek el. A 7* alegység körülbelül a teljes HMW glutenin tartalom 27%-t (pl. Cheyenne), míg a 7-es a 41%-át alkotja (pl. Chinese Spring). A HMW-glutenin alegységek mennyiségi elemzése céljából Marchylo és mtsai (1989) RP-HPLC technikát alkalmaztak. Kimutatták, hogy a Bx7 alegység mennyiségének növekedése a tészta erősségének és rugalmasságának növekedését vonja maga után (Juhász és mtsai, 2003).

A molekuláris marker alapú szelekció (MAS) a nemesítők hatékony eszköze egy adott agronómiai tulajdonság javítását célzó nemesítési programban. A nemesítésben felhasználni kívánt DNS allélek izolálása lehetővé teszi, az adott fajtában rejlő jó tulajdonságok modern fajtákba történő beépítését. A megfelelő markerek ismeretében a módszer gyors és hatékony szelekciós lehetőség, már a nemesítés korai generációiban is. Az új markerek és a velük

szoros összefüggésben álló minőségi tulajdonságok ismerete segíti a nemesítőket, új minőségi források munkájukba való bevonásába illetve a már folyamatban levő keresztezési programokból származó eredmények megértésében. A pályázati munka keretében megalapozhatunk egy olyan új módszert, ami gyors minőségi értékelést tesz lehetővé és segíti az új törzsek, fajtajelöltek kiválogatását.

A pályázat során vállaltuk:

Első év (2005):

1. Az 1Bx7 gén promóterének klónozását két ismert külföldi (egy normál- és egy túltermelő) és három hazai (egy Bx7-et átlag alatti szinten termelő, egy normál- valamint egy túltermelő) búza fajtából.
2. A megklónozott promóterek DNS szekvenciájának meghatározását.
3. A meghatározott DNS szekvenciák *in silico* elemzését. A túltermelésben érintett promóter elemek keresését.
4. Az 1Bx7 génjének megklónozását két hazai búza fajtából (egy normál- és egy túltermelő).
5. Real-time PCR módszer kidolgozását az 1Bx7 géndózisának meghatározására.

Második év (2006):

6. A megklónozott gének DNS szekvenciájának meghatározása.
7. A megismert DNS szekvenciák alapján markerek tervezése a Bx7 allél variánsainak (Bx7 – Bx7*) elkülönítésére.
8. A megismert DNS szekvenciák alapján markerek tervezése a Bx7 túltermelő fajták azonosítására.
9. A tervezett markerek validálása ismert tulajdonságú külföldi és hazai búza fajtákon.
10. Az 1Bx7 géndózisának meghatározása 6-8 ismert külföldi (ebből 4-6 Bx7 túltermelő) búza fajtában és 3-4 régi magyar búza fajtában.

Eredmények:

1. Promóter szekvenálási kísérleteinkhez három Bánkúti 1201 törzset választottunk ki, az alultermelő (AT) 11299 törzset, a normál termelő (NT) 11301 törzset és a túltermelő (TT) 11305 törzset. Ezen kívül a Chinese Spring (normál termelő) és Glenlea (túltermelő) fajtákat vizsgáltuk. Két leveles állapotú búza növényből levélmintát vettünk és QIAGEN növényi genomi DNS kinyerő kit (DNeasy) segítségével tiszta DNS mintát állítottunk elő.

Az irodalomban korábban publikált kétszer két primer párral felszaporítottunk egy-egy, kb. 2,4 kbp hosszúságú DNS fragmentet, mely tartalmazott egy, a kódoló részt megelőző, nem átíródó 1,9 kbp hosszú szakaszt. A primerek szekvenciája:

A *Glu-1Bx* gén promóterének amplifikálásához használt primerek.

B7KF	5' GAGCTCTCCCATCCAATTG 3'
B7KR	5' AGAAGCTTGG CCTGGATAGT 3'
B7BF	5' GGGTCGATGGTATCAATCC 3'
B7BR	5' GGCCTGGATAGTATGACCC 3'

A kb. 2,4 kbp hosszú DNS fragmenteket pCR2.1-TOPO klónozó rendszer segítségével klónoztuk poli-A farkazás után az Invitrogen cég kísérleti leírását követve. Mind az öt PCR terméket a ligálás után transzformáltuk és 3-3 kolóniából plazmidot preparáltunk az inszert méretének ellenőrzésére és restrikciós analízisre. Egy-egy promóter szakaszt tartalmazó klónt kiválasztottunk szekvenálásra.

2. A szekvenálást mindkét szálon elvégeztük a „primer walking” módszert alkalmazva, az alább megadott szekvenciájú primerekkel, valamint a klónozó vektoron lévő M13 primerekkel.

A *Glu-1Bx* gén promóterének szekvenálásához használt primerek

Forward primerek:	
Bx7F14639	5' TTACCCAAACCCCAACTGCC 3'
Bx7F15040	5' ACGAGAGAAGAAGTGCGTCG 3'
Bx7F15470	5' ATGGGCTTTAGGAGAGATGG 3'
Bx7F15887	5' TAGGCTAAACTAACCTCGGC 3'
Reverse primerek:	
Bx7R16182	5' TAACGTCTCGGAGTTGCTGG 3'
Bx7R15771	5' GCTAAAGCCACGTAATGGG 3'
Bx7R15369	5' ATGACGTGCAAAAAGTTGG 3'
Bx7R15027	5' CACGCCATCACTAATATTCCAC 3'
Bx7R14665	5' TTTGCTGGGCAGTTGGG 3'

A kapott szekvencia adatokat a GCG szoftvercsomag segítségével elemeztük és összeállítottuk a teljes szekvenciát a nem kódoló (upstream) régióra, mind az öt búzafajta esetében. Az alábbi eltéréseket találtuk (a pozíciók a génbankban található szekvencia szerint vannak megadva):

A *Glu-1Bx* gén promóterében azonosított eltérések különböző fajtákban.

Pozíció	14331	14586	14764	14946/14947	15024	15414	15603	15825	15924
Chinese Sp.	A	A	A	-	G	A	T	T	C
Glenlea	A	AA	A	43 bp insz	C	A	T	-	C
Bánkúti AT	A	-	A	-	G	A	T	-	C
Bánkúti NT	A	-	A	-	G	G	A	-	T
Bánkúti TT	G	A	G	43 bp insz	C	A	T	-	C

3. A fenti táblázat alapján megállapítottuk, hogy a túltermelő Glenlea és Bánkúti 1201 11306 fajták Bx7 promóterében található egy 43 bp hosszú inszerció az irodalomban ismert normáltermelő Cheyenne illetve az általunk szekvenált alul- és normáltermelő fajták Bx7 promóteréhez képest. Az inszerció mind domináns, mind kodomináns markerekkel (eltérő méretű PCR termék) kimutatható. Mivel a PCR reakciók során mindig fennáll a reakció gátlásának lehetősége (hamis negatív reakció), ezért a kodomináns marker tervezése mellett döntöttünk. A GCG programcsomag segítségével olyan primereket kerestünk a Bx7 szekvenciában, amelyek az inszerció két oldalán találhatóak, de nincsenek jelen máshol az adatbázisban található szekvenciában. Az így kiválasztott szekvenciákat BLAST program segítségével leellenőriztük az összes ismert növényi DNS szekvenciával szemben, és azokat tartottuk meg, amelyek kizárólag a búza Bx7 promóterhez kötődnek. A kapott két-két forward és reverz primert megszintetizáltattuk, hogy az általuk alkotott összesen 4 lehetséges primer párból kísérleti úton válasszuk ki a legjobbat.

A *Glu-1Bx* gén promóterében található inszerció kimutatására tervezett primerek.

Név:	Írány:	Pozíció:	O.p.:	Szekvencia:
Bx7F14642	Forward	14637	54,4 °C	TTTACCCAAACCCCAACTG
Bx7F14639	Forward	14639	58,5 °C	TTACCCAAACCCCAACTGCC
Bx7R15027	Reverz	15022	54,9 °C	CACGCCATCACTAATATTCCAC
Bx7R15369	Reverz	15369	53,2 °C	ATGACGTGCAAAAAAGTTGG

4. A korábban kiválasztott normáltermelő (11301) és túltermelő (11306) törzsekből tisztított DNS-t templátként használva a Bx7 gént felszaporítottuk és pCR2.1-TOPO (Invitrogen) klónozó rendszer segítségével klónoztuk. A klónozott 2565 bp hosszú DNS fragmentet *HindIII*, *SpeI* és *BstXI* restriktációs enzimekkel feldaraboltuk és a kivágott szakaszokat pGEM5 plazmid vektorba szubklónoztuk. A szubklónozás során kapott plazmidokon lévő Bx7 fragmenteket M13 Forward és M13Reverse primereket használva szekvenáltuk. A teljes Bx7 szekvenciát az így kapott 400-500 bp hosszú szakaszokból a GCG programcsomag segítségével szerkesztettük meg.

5. A Bx7 génre a primer3 szoftver segítségével PCR primereket és TaqMan próbát terveztünk. A primerek specifikusságát ellenőriztük klónozott HMW glutenin géneken és azt találtuk, hogy csak a Bx-en ad terméket a PCR reakció. A real-time PCR reakciót ABI 7000 készüléken optimalizáltuk. A reakcióhoz a Glenlea-ből izolált DNS-t használtuk templátnak. Az optimális reakció elegy 750 nM forward- és reverz primert, és 100 nM TaqMan próbát tartalmazott. A PCR ciklusok 15 perc kezdeti denaturáció után 15 mp 95 C és 40 mp 60 C voltak.

A *Glu-1Bx* gén mennyiségi meghatározására tervezett primerek és TaqMan próba.

Bx7F18096	TTTTACCCAAACCCCAACTG
Bx7R18196	CACGCCATCACTAATATTCCAC
Bx7Probe	JOE-CAGGACAATGGCTGCAACCAGGAC-TAMRA

Belső referenciaként a puroindolin B gént terveztünk használni. Az elsőként kipróbált primer pár (Alary és mtsai, 2002) azonban rendkívül erős primer-dimer képzési hajlamot mutatott, ezért még TaqMan próbával kombinálva sem működött megbízhatóan a reakció. Kipróbáltunk egy másik puroindolin B-re tervezett primer párt (Amoroso és mtsai, 2004), azonban hasonlóan rossz eredményt kaptunk. Ezért egy kis molekulásúlyú glutenin génre (Terzi és mtsai, 2003) és egy lipid transzfer protein génre (Alary és mtsai, 2002) tervezett primer párt is kipróbáltunk. Ez utóbbi primer párral kaptuk a legmagasabb reakció hatékonyságot, ezért a további kísérletek során ezt használtuk. A reakció terméket SybrGreen I duplaszálú DNS kötő festékkel detektáltuk. A PCR ciklusok azonosak voltak Bx7 real-time PCR ciklusaival.

A lipid transzfer protein gén mennyiségi meghatározására szolgáló primerek.

Ltp490F	TGCGACGGCGTCAAGAA
Ltp490R	AGCGCTTTGGCGATCG

Mind a két reakció teszteltük genomi DNS-ből készült hígítási soron és a PCR hatékonyságot kielégítőnek (90-100 %) találtuk.

6. A normál- és túltermelő Bánkúti 1201 törzsből klónozott Bx7 gén szekvenciákat összehasonlítottuk egymással és az adatbankban található szekvenciájával (Cheyenne búzából származik). Megállapítható, hogy a Bx7 HMW glutenin fehérjét normál- és túltermelő Bánkúti 1201 törzsekben a Bx7 HMW glutenin gének szekvenciájában eltérés van. A túltermelő törzsben egy pont mutáció és egy 18 nukleotidból álló duplikáció van a gén 3' végéhez közel. Mint az a Függelékben látható összehasonlításból kitűnik, a Cheyenne búza genomjában található Bx7 HMW glutenin fehérje gén szekvenciája megegyezik a Bx7 HMW glutenin fehérjét normál mennyiségben termelő Bánkúti 1201 törzsben kódolt Bx7 HMW glutenin fehérje gén szekvenciájával.

A pályázat keretében elvégzett kísérleteink eredményeként megállapíthatjuk, hogy a Bx7 HMW glutenin fehérjét túltermelő Bánkúti 1201 törzs (11306) megkülönböztethető a többitől az 1Bx7 HMW glutenin gén szekvenciája alapján, felhasználva a 18 nukleotid hosszúságú (CAA CCA GGA CAA GGG CAA) inszerciót. Ez a különbség alkalmasnak látszik egy PCR alapú marker kidolgozásához a későbbiekben.

7. A GCG programcsomag segítségével olyan rövid szakaszokat kerestünk a Bx7 szekvenciában, amelyek (az előző pontban azonosított) 18 bp hosszú inszerció két oldalán találhatóak, de nincsenek jelen máshol az adatbázisban található szekvenciában. Ezekre a szakaszokra PCR primereket terveztünk úgy, hogy az olvadáspontjuk között a lehető legkisebb különbség legyen. A programcsomag segítségével leellenőriztük, hogy a tervezett primerek nem képeznek-e másodlagos szerkezetet (hairpin loop), illetve nem kötődnek-e egymáshoz vagy saját magukhoz (primer-dimer). A másodlagos szerkezetet vagy primer-dimert képző primereket kizártuk. Az így jónak talált szekvenciákat BLAST program segítségével leellenőriztük az összes ismert növényi DNS szekvenciával szemben, és azokat tartottuk meg, amelyek kizárólag a búza Bx7 génhez kötődnek. A kapott két-két forward és reverz primert megszintetizáltattuk, hogy az általuk alkotott összesen 4 lehetséges primer párból kísérleti úton válasszuk ki a legjobbat.

A *Glu-1Bx* gén 3' végén található 18 bp inszerció kimutatására tervezett primerek.

Név:	Írány:	Pozíció (5'):	Olvadáspont:	Szekvencia:
Bx7F18096	Forvard	18096	58,9 °C	GGGCAACAACCAGGACATGA
Bx7F18192	Forvard	18192	58,5 °C	GCAGTCAGGACAAGGGCAT
Bx7R18391	Reverz	18410	56,0 °C	GTTCTATCACTGCCTGGTCG
Bx7R18393	Reverz	18412	54,9 °C	GAGTTCTATCACTGCCTGGT

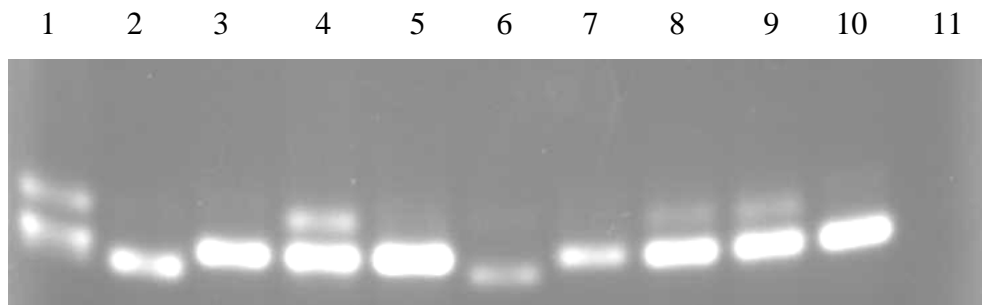
A Bx7 gén kódoló szakaszára tervezett primereket a Bánkúti 1201 11301 törzsből izolált DNS-en teszteltük. A PCR reakcióhoz DynaZyme enzimet használtunk a gyártó által javasolt pufferrel. A primerek mind a négy kombinációban működtek, azonban a Bx7F18096 Forvard primer használata esetén 315-317 bp hosszú, míg a Bx7F18182-vel 229-231 bp hosszú termékeket kapunk. Tekintve, hogy a túltermelőből és a normáltermelőből felszaporított PCR termékek között mindössze 18 bp különbség várható, csak a rövidebb termékeket adó Bx7F18182-vel dolgoztunk tovább. Ezzel a forvard primerrel szemben mind a két reverz primert kipróbáltuk és a reakciókat optimalizáltuk. Az optimális PCR körülmények a következők voltak: kezdeti denaturáció 95°C-on 5 percig, majd denaturáció 30 másodpercig 95°C, kapcsolás 67°C-on 15 másodperc, végül lánchosszabbítás 72°C-on 15 másodperc, 45 ciklusban ismételve. Mivel a Bx7R18393 reverz primer használatakor gyakran megjelent egy addicionális sáv kb. 300 bp méretnél, ezért a Bx7F18182-Bx7R18391 primerpárt használtuk a továbbiakban.

8. A Bx7 promóterre tervezett primereket (lásd 3. pont) mind a négy lehetséges párosításban kipróbáltuk PCR reakcióban a Bánkúti 1201 11306 törzsből izolált Bx7 promótert tartalmazó plazmidot használva templátként. A PCR reakcióhoz DynaZyme enzimet használtunk a gyártó által javasolt pufferrel. A kapcsolási hőmérsékletet gradiens PCR készülékben (iCycler, BIO-RAD) optimalizáltuk mind a négy reakcióra. Az elvégzett kísérletek alapján úgy találtuk, hogy a Bx7F14639 jelű forvard primerrel a reakció robosztusabban működik, valamint a Bx17 allél esetén is ad eredményt, míg a Bx7F14642 jelű primert használva a reakció nem működik a Bx17 allélon. A reverz primerek közül mind a kettő jó eredményeket adott a Bx7F14639 primerrel szemben, azonban a Bx7R15027 használata esetén a PCR termék hossza csak 429 bp, míg a Bx7R15369 használata esetén a termék 776 bp. A rövidebb PCR termék két okból is előnyös: (i) jobb a PCR reakció hatékonysága, (ii) nagyobb a relatív

különbség a normáltermelőnél illetve a túltermelőnél kapott PCR termék hossza között, ezért könnyebb az elválasztásuk. Ennek megfelelően a Bx7F14639-Bx7R15027 primer párt találtuk a legjobban használhatónak a túltermelő Bx7 promóterében található 43 bp inszerció kimutatására, és a továbbiakban ennek markerként való használatát vizsgáltuk.

A reakciót kipróbáltuk Bánkúti 1201 11305 törzsből izolált genomi DNS-en és a reakció körülményeket tovább finomítottuk. Az optimális PCR körülmények a következők voltak: 5 perc kezdeti denaturációt (95°C) követően denaturáció 95°C-on 30 másodpercig, majd kapcsolás 60°C-on 20 másodpercig, végül lánchosszabbítás 72°C-on 40 másodpercig, 45 ciklusban ismételve.

9. A markert validáltuk ismert HMW allél összetételű Bx7 normál- illetve túltermelő búzafajtákon (1. ábra). Eredményeink azt mutatják, hogy valamennyi Bx7+By8 allélt hordozó fajta a hosszabb (247 bp) PCR terméket, míg az összes Bx7*+By9 fajta a rövidebb (229 bp) terméket adja. A PCR termék mérete ugyanakkor nem korrelál a Bx7 túltermeléssel, hiszen a Bx7 normáltermelő Chinese Spring ugyanúgy a nagyobb terméket adja, mint a Bx7 túltermelő Glenlea.



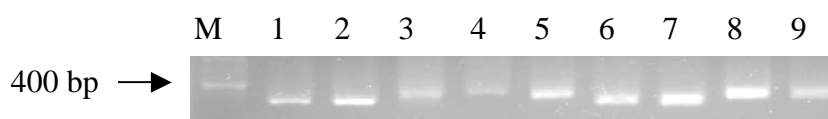
1. ábra: PCR termékek elválasztása agaróz gélelektroforézissel. 1. **Bánkúti 1201 11306**, 2. Mv Emese, 3. **Bluesky**, 4. **Vona**, 5. **Chara**, 6. Cheyenne, 7. **Chinese Spring**, 8. **Glenlea** 9. **Kukri A08** 10. **Red River1** 11. negatív kontrol. Vastag betűvel kiemelve a Bx7+By8 allélt hordozó fajták.

A markert kipróbáltuk Bánkúti 1201 izogén vonalakon is, amelyeknek a HMW glutenin fehérje összetételét korábban már jellemezték, és így a *Glu-B1* alléljuk már ismert. Az eredmények megerősítették a külföldi fajtákkal kapott eredményeket, tehát a hosszabb PCR termék megjelenése egyértelműen és kivétel nélkül a Bx7+By8 allélhez kötődött, ugyanakkor csak részlegesen korrelált a Bx7 túltermeléssel.

1201 vonalak tesztelése a Bx7 génre tervezett PCR markerrel. Vastag betűvel kiemelve a nagyobb PCR termék és a Bx7+By8 allél.

Bánkúti 1201 vonal	PCR termék mérete (bp)	Glu-B1 összetétel
B12	247	7+8
B18	247	7+8
B26	229	7*+9
B28	247	7^{OE}+8
B30	229	7*+9
B35	247	7^{OE}+8
B38	229	7*+9
B41	247	7^{OE}+8
B44	229	7*+9
B47	247	7+8
B78	229	7*+9
B88	247	7^{OE}+8
B95	247	7+8

A markert validáltuk ismert HMW összetételű Bx7 normál- illetve túltermelő búzafajtákon (2. ábra). Eredményeink azt mutatják, hogy valamennyi Bx7 túltermelő fajta a hosszabb (429 bp) PCR terméket, míg az összes nem túltermelő fajta a rövidebb (386 bp) terméket adja. A PCR termék mérete ugyanakkor nem korrelál a Bx7*+By9 allél jelenlétével, hiszen a Bx7-et tartalmazó Chinese Spring ugyanúgy a kisebb terméket adja, mint a Bx7*-ot tartalmazó Cheyenne.



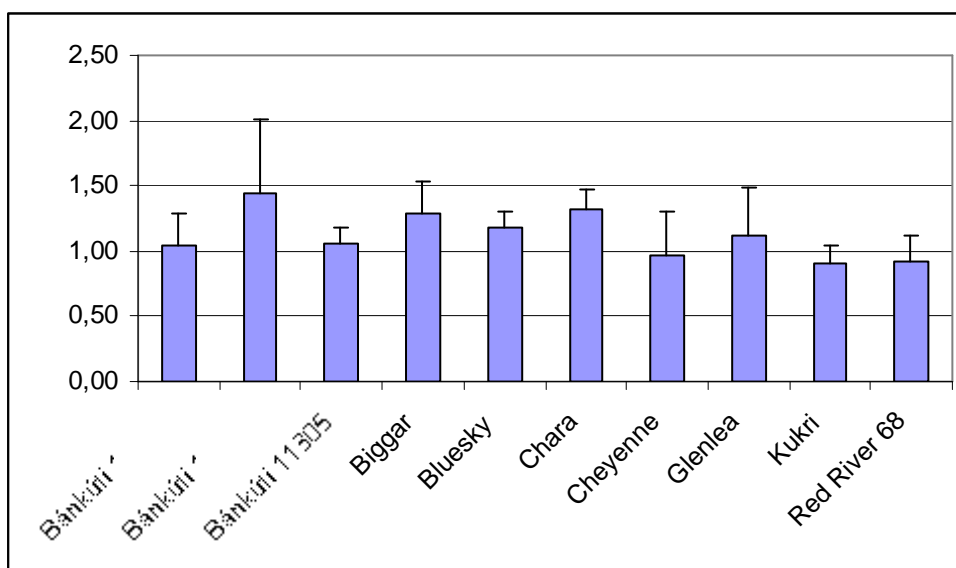
2. ábra: PCR termékek elválasztása agaróz gélelektroforézissel. M: Molekulasúly standard (GeneRuler, Fermentas), 1: Cheyenne, 2: Chinese Spring, 3: **Bluesky**, 4: **Kukri**, 5: **Glenlea**, 6: Mv. Emese, 7: Vona, 8: **Chara**, 9: **Bánkúti 1201 11306**. A Bx7 túltermelő fajták vastag betűvel vannak kiemelve.

A markert kipróbáltuk Bánkúti 1201 izogén vonalakon is, amelyeknek a HMW glutenin fehérje összetételét korábban már jellemezték, és így a Bx7 termelésük mértéke már ismert. Az eredmények megerősítették a külföldi fajtákkal kapott eredményeket, tehát a hosszabb PCR termék megjelenése egyértelműen és kivétel nélkül a Bx7 túltermeléshez kötődött, ugyanakkor csak részlegesen korrelált a különböző Glu-B1 allélok jelenlétével.

Bánkúti 1201 vonalak tesztelése a Bx7 promóterre tervezett PCR markerrel. Vastag betűvel kiemelve a nagyobb PCR termék és a Bx7 túltermelés.

Bánkúti 1201 vonal	PCR termék mérete (bp)	Glu-B1 összetétel
B12	386	7+8
B18	386	7+8
B26	386	7*+9
B28	429	7^{OE}+8
B30	386	7*+9
B35	429	7^{OE}+8
B38	386	7*+9
B41	429	7^{OE}+8
B44	386	7*+9
B47	386	7+8
B78	386	7*+9
B88	429	7^{OE}+8
B95	386	7+8

10. A *Glu-1Bx* géndózisának meghatározásához genomi DNS-t izoláltunk 8 ismert nemzetközi búzafajtából és 3 Bánkúti 1201 vonalból. A Bx7 illetve az Ltp génekre tervezett primer-párokkal real-time PCR-t végeztünk a 100-szorosan illetve 1000-szeresen meghígított DNS mintákon. Kalibrátorként a Chinese Spring fajtából izolált DNS-t használtuk 10-10000-szeres hígításban. A kapott standard görbék alapján meghatároztuk minden mintában a Bx7 és az *ltp* gének mennyiségét a kalibrátorhoz (Chinese Spring) képest. A két mennyiség hányadosa megfelel a *Glu-1Bx* géndózisának. A 3. ábrán feltüntettük a kapott értékeket a hozzájuk tartozó szórással. Amint az ábrán látható, egy Bánkúti 1201 vonal kivételével (ahol az eredmények szórása túl nagy) minden mintában a Chinese Spring-gel azonos a *Glu-1Bx* géndózisa.



3. ábra: A *Glu-1Bx* géndózis a néhány búzafajtában real-time PCR-rel meghatározva.

Irodalomjegyzék:

- Alary R, Serin A, Duviau MP, Joudrier P, Gautier MF (2002) Quantification of Common Wheat Adulteration of Durum Wheat Pasta Using Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cereal Chem.* 79: 553-558
- Amoroso M.G., Longobardo L., Capparelli R. (2004) Real Time RT-PCR and flow cytometry to investigate wheat kernel hardness: role of the puroindoline genes and proteins. *Biotech. Lett.* 26: 1731-1737
- Juhász A, Larroque O.R., Tamás L., Hsam S.L.K., Zeller F.J., Békés F., Bedő Z. (2003) Bánkúti 1201-an old Hungarian wheat variety with special storage protein composition. *Theor. Appl. Genet.* 107: 697-704
- Marchylo B.A., Kruger J.E., Hatcher D.W. (1989) Quantitative reversed-phase high-performance liquid chromatographic analysis of wheat storage proteins as a potential quality prediction tool. *J. Cereal Sci.* 9: 113-130.
- Marchylo B.A., Lukow O.M., Kruger J.E. (1992) Quantitative variation in high molecular weight glutenin subunit 7 in some Canadian wheat. *J. Cereal Sci.* 15: 29-37.
- Terzi V., Malnati M., Barbanera M., Stanca A.M., Faccioli P. (2003) Development of analytical systems based on real-time PCR for *Triticum* species-specific detection and quantitation of bread wheat contamination in semolina and pasta. *J. Cereal Sci.* 38: 87-94

Közlemények:

1. Gárdonyi Márk, Szűcs Péter, Bányai Judit, Bedő Zoltán, Tamás László: A Bx7 HMW-glutenin alegység transzkripciója túltermelő és normáltermelő búzafajtákban az érés során (XI. Növénynevelési Tudományos Napok, Budapest, 2005. március 3-4, p. 30)
2. M. Gárdonyi, P. Szűcs, J. Bányai, K. R. Gale, B. J. Butow, M. K. Morell, Z. Bedő, L. Tamás: Molecular background of the overexpression of *Glu-1Bx* HMW glutenin subunit (7th International Wheat Conference, Mar del Plata, Argentina, 27 November – 2 December 2005. p. 320)
3. M. Gárdonyi, P. Szűcs, J. Bányai, Z. Bedő, L. Tamás: Transcription of the *Glu-1Bx* HMW Glutenin Subunit Gene During Grain Filling in Several Wheat Cultivars (2006 Gluten Workshop, San Francisco, USA, 14-16 September 2006. p. 43.)

Készülő kéziratok:

1. Keresztyeni, E., Gárdonyi, M., Békés, F., Tamás, L., Rakszegi, M., Láng, L., Bedő, Z.: Selection Criteria for Breeding Wheat Genotypes with Over-expression of *Glu-1Bx7*
2. M. Gárdonyi, P. Szűcs, J. Bányai, Z. Bedő, L. Tamás: Molecular background of the overexpression of *Glu-1Bx* HMW glutenin subunit

A pályázat keretében elért hasznosítható eredmények:

A *Glu-1Bx* gén promóterére tervezett PCR markert együttműködés keretében az MTA Martonvásári Mezőgazdasági Kutatóintézete rendelkezésére bocsátottuk, ahol azt egy jelenleg futó nemesítési programban használják Bx7 túltermelő vonalak azonosítására. Az együttműködés során elért eredmények 2007. folyamán nemzetközi folyóiratban kerülnek közlésre (1. készülő kézirat).

Az általunk izolált Bx7 promóter felhasználható búzában vagy más gabonában transzgének endospermium specifikus kifejezésére.

Összefoglalás:

A pályázat keretében:

- Megklónoztuk a *Glu-1Bx* gén promóterét két ismert külföldi (egy normál- és egy túltermelő) és három hazai (egy Bx7-et átlag alatti szinten termelő, egy normál- valamint egy túltermelő) búza fajtából.
- Meghatároztuk a klónozott promóterek DNS szekvenciáját.
- A túltermelő búzafajták promóterében azonosítottunk egy 43 bp hosszú inszerciót, amely az alul- és normáltermelő fajtákban nincs jelen.
- Az inszerció kimutatására kodomináns PCR markert terveztünk és a markert ismert nemzetközi fajtákban validáltuk.
- Megklónoztuk a *Glu-1Bx* gén fehérjét kódoló szakaszát két hazai (egy normáltermelő, Bx7* allélt hordozó és egy túltermelő, Bx7 allélt hordozó) búza fajtából.
- Meghatároztuk a klónozott gének DNS szekvenciáját.
- A Bx7 allél 3' végén azonosítottunk egy 18 bp hosszú inszerciót, amely a Bx7* allélban nincs jelen.
- Az inszerció kimutatására kodomináns PCR markert terveztünk és a markert ismert nemzetközi fajtákban validáltuk.
- Kidolgoztunk egy real-time PCR módszert a *Glu-1Bx* géndózisának meghatározására.
- Meghatároztuk a *Glu-1Bx* géndózisát 8 ismert külföldi (ebből 6 Bx7 túltermelő) búza fajtában és 3 régi magyar búza fajtában.

Budapest, 2007. február 28.

Dr. Gárdonyi Márk
témavezető